

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870768

研究課題名(和文) 中枢神経系における色覚情報処理機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the neural mechanisms of color vision in the central nervous system

研究代表者

関 洋一 (Seki, Yoichi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30634472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多くの動物は異なる光波長に感度を持つ少数の光受容細胞の活動をもとに、色を識別することができる。しかし、中枢神経系において色覚を生成する神経機構については、未解明な部分が多い。ショウジョウバエは視覚系の初期神経回路において、ヒトとも多くの共通点を持ち、神経細胞の数が少なく、遺伝学的な技術が発達していることなどから、色覚生成の神経機構を体系的に分析していくためのよいモデルである。本研究では、色覚情報処理機構解明のための第一歩として、ショウジョウバエを用い、色覚情報処理中枢の神経群を対象に電気生理学的手法の確立を行った。また、行動学的に色識別能を評価するための、行動実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Many animals can discriminate color based on the activities of several photoreceptor classes that have a distinct spectral sensitivity. However, neural mechanisms underlying color vision are not yet fully understood. *Drosophila melanogaster* offers a good model system for deciphering the neural basis of color vision due to the similarity of the early visual circuits with humans, the numerical simplicity of the circuits and the availability of rich genetic tools. In this study, as a first step toward understanding the neural mechanisms of color vision, we aimed to establish electrophysiological recordings from CNS neurons of the fly brain involved in color vision. In addition to the electrophysiological approach, we established a behavioral experiment to evaluate the color discrimination ability of the fly.

研究分野：神経行動学、動物生理学、感覚生理学

キーワード：ショウジョウバエ 色覚 電気生理 パッチクランプ 色識別

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物と昆虫の間には、少数の異なる分光感度を持つ光受容体による色識別機構の存在や視覚情報処理経路の機能構造的共通性が明らかにされている<sup>(1)</sup>。サルやヒトなどでは、3つの異なる分光感度を持つ光受容体による色弁別 (trichromacy) があり、それぞれ青、緑、赤の波長帯域に分光感度のピークを持つ光受容細胞の活動の組み合わせが、色覚の基盤をなしている。光受容細胞からの情報は、網膜の神経回路を経て修飾され、網膜からの出力である神経節細胞において、(緑 on, 赤 off) などの応答を示す色対比細胞 (color opponent cell) の存在が報告されている。さらに、網膜からの情報は外側漆状体の小細胞層や顆粒細胞層で中継され、一次視覚野である V1 野さらに V2 野, V4 野などの領域に投射される。ところが、これらの領域で色覚が形成される神経基盤については未解明である。昆虫の色覚に関する研究では、これまでハチ類、チョウ類、ハエ類などで光受容細胞の性質や色識別能についてよく調べられている。種によって可視波長範囲および光受容細胞の数は異なるが、3-5 種類程度の分光感度の異なる光受容細胞を持ち、色覚を生成していると考えられている。例えばミツバチでは、紫外、青、緑帯域にピークを持つ 3 タイプの光受容細胞を持ち、色対比細胞の存在、色恒常性などの高次機能があることが示された<sup>(2)</sup>。しかし、色覚の生成に関しては、特に中枢神経系での情報処理に関する理解が遅れている。ショウジョウバエは、遺伝学的手法の発展により、特定の神経群の標識および機能阻害などが行える技術が確立され、神経回路を構成する神経細胞数の少なさと相まって、近年脳科学の材料として有用なモデルに発展した。また、色覚情報処理経路の神経回路について、詳細な解剖学的構造が明らかになりつつある<sup>(1,3,4)</sup>。これらに加え、研究代表者はショウジョウバエの脳における電気生理学的手法

の高い技術を有している<sup>(5,6)</sup>。よって本研究では、詳細な解剖学的基盤のある神経回路を対象に、機能を分析できる電気生理学的手法を適用することにより、これまでに調べられてきたどの系よりも、神経回路レベルで詳細に色覚の生成機構が明らかにできる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの色覚中枢に電気生理学的手法を適用し、色覚情報のコーディング機構を明らかにすることを目的とした。

まず、ショウジョウバエの中枢神経系において色覚情報処理に関与する領域の神経群から、分光感度を電気生理学的に計測することを計画した。光受容細胞での分光感度特性と 2 次、3 次神経細胞における分光感度特性を比較することは、色情報が神経階層を経るに従って、どのように特徴抽出および統合されていくかを明らかにするために重要である。また、脳内に存在する色覚情報処理機構を考察する上で、実際にショウジョウバエの色覚系がどの程度の波長識別能を有しているかを知ることは重要である。ショウジョウバエの波長識別能を評価するための、学習を利用した行動実験を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 光刺激装置の構築

細胞内記録や網膜電図において分光感度を計測するためには、ショウジョウバエの光受容細胞がカバーする光の波長範囲にわたって、一定間隔で光子数を合わせた単波長の光刺激を与える必要がある。300-700nm の波長範囲において、光の強度および波長をコントロールした刺激を与えるため、300W キセノン光源とモノクロメーターを組み合わせた光刺激装置を構築した (図 1)。

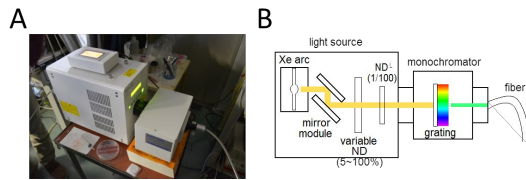


図 1.

A: キセノン光源とモノクロメーターから構成される光刺激装置。B: 光刺激装置の模式図。

## (2) 色識別能を評価する行動実験

iPad2 の液晶ディスプレイからの光を条件刺激、スクロースを無条件刺激とした報酬学習実験を行った。まず、iPad2 からの RGB いずれかの色を表示し、10 匹のショウジョウバエと 0.5M スクロースを染み込ませた紙をシャーレに入れ、15 分間条件付けを行った。この時、何も入れていないシャーレに入れたハエを対照群(コントロール)とした。その後、ハエを何も入っていない別のシャーレに移し、5 分間の 2 色選択テストを行った(図 2)。

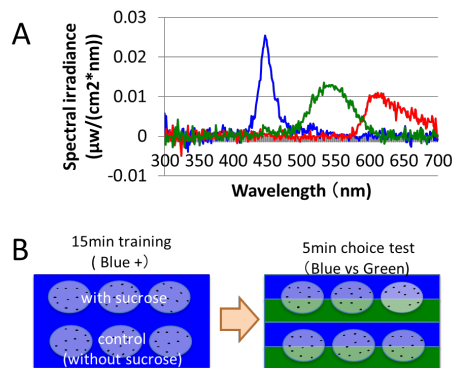


図 2.

A: iPad2 液晶ディスプレイに表示される RGB 色のスペクトル。B: 行動実験のパラダイムの模式図。

## 4. 研究成果

### (1) 刺激法(刺激プロトコル)の決定

実際にショウジョウバエの網膜から網膜電図(ERG)を計測し、光刺激装置からの刺激について評価を行った(図 3)。分光感度を計測するために適切な光強度、刺激時間や刺激間隔などの選定を行った。また、波長間で刺激強度を合わせるため、光子数が揃うように光

強度の調整を行った。

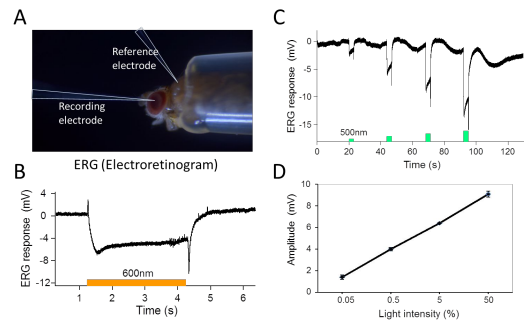


図 3.

A: 網膜電図のプレパレーション。B: 600nm の光刺激に対する網膜電図の典型的なトレース。C: 500nm の 4 段階の光強度変化に対する網膜電図のトレース。D: 4 段階の光強度に対する網膜電図の振幅のプロット。

### (2) 標的神経群の選定

ショウジョウバエの視葉(視覚中枢)は視葉板(lamina)、視髄(medulla)、視小葉(lobula)、視小葉板(lobula plate)から構成されている。最近の研究で色覚に関わると考えられている R7,R8 の視細胞は視髄の第 6 層と第 3 層へ投射していることが示された。そして、TM5 と TM9 呼ばれる 2 次神経細胞により、視小葉のそれぞれ第 5 層と第 1 層へ運ばれている(3,4)。標的細胞の候補として、いくつかの GAL4 系統のショウジョウバエを入手し、GFP の発現に対する免疫染色を用い、共焦点顕微鏡において標識神経群の形態の観察を行った。その結果、GMR53A01-GAL4 では、ヒスタミン受容体(ort)を発現する 2 次神経細胞と考えられる視葉板、視髄の神経細胞群が、NP1035-GAL4 および NP6099-GAL4 では、3 次神経細胞と考えられる視小葉の大きな神経細胞がラベルされることを確認した(4,7)。また、細胞体の数や分布を調べ、パッチクランプ法によって、電極がアクセスできる適切なプレパレーションの作成に利用した。

(3) *in vivo* ホールセルパッチクランプ法  
 ホールセルパッチクランプ法により、上述の GAL4 系統でラベルされた色覚系 2 次神経細胞及び 3 次神経細胞からそれぞれ数例の記録に成功した。しかし、いずれの記録においても光刺激に対する波長特異的な応答は観察されなかった。光刺激に対する明確な応答が記録できなかった、また安定した計測が実現できなかった理由として以下の要因が考えられる。

神経細胞の特性として、細胞体からの記録では刺激に対する応答がとらえにくい可能性。視葉のニューロンの何割かは、ノンスパイキングニューロンである可能性が示唆されている。特に視髄の 2 次神経細胞は 1 次神経からの入力（ヒスタミンの放出）に対し、過分極応答をするという報告もある。これらの理由から、電気的活動の中心から離れた細胞体では、十分な電位変化が記録できない可能性がある。

2 次神経細胞の細胞体の小ささ。視髄の領域は非常に高密度で細胞が密集しており、細胞体のサイズも 5 $\mu$ m 以下とかなり小さい。パッチクランプの難易度が高く、また、神経線維の細さも電気的な活動がとらえにくい一因となっている可能性がある。

(4) 色識別能を評価する行動実験系の確立  
 野生型 Canton S を用いて緑と青で報酬学習実験を行った結果では、条件付けした個体は、二色選択テストにおいてコントロールよりも有意に報酬を与えた色を選択した（図 1）。同様に赤と青で報酬学習実験を行った結果でも、条件付けした個体は、報酬を与えた色を選択した。これより、緑と青、赤と青の識別が可能であることがわかった。しかし、赤と緑で報酬学習実験を行った結果では、有意に報酬を与えた色を選択しなかった（図 4）。赤と緑は波長領域が近く、同じ光受容体（rh6）で受容されたため赤と緑は識別でき

なかった可能性が考えられる。さらに、光受容体と色識別能との関係を調べるために、光受容体の欠損している変異体を用いて実験を行った。その結果、rh1 が欠損している ninaE は緑と青を識別できないことがわかった。このことから、rh1 も色覚への関与が示唆された。

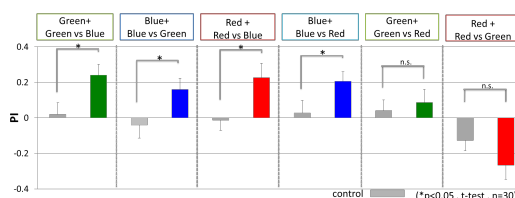


図 4. 野生型 Canton S での色識別行動実験の結果。

$$(PI = N_{\text{paired color}} - N_{\text{unpaired color}} / N_{\text{total}})$$

#### (5) 今後の展望

研究計画では、色覚系 2 次、3 次神経細胞から分光感度の計測法を確立し、波長特異性や色対比性の応答を示す神経群の探索と同定まで進める予定であった。実際に計測を始めて明らかになった課題から計画が遅れている。今後は計測に適した神経群を吟味し、体系的に色覚中枢の神経群を対象に分光感度の計測を行っていく。記録を行った神経細胞は染色し、神経の分類・同定および詳細な形態の解析を行う。これらのデータを蓄積することにより、色覚神経回路の機能解析に基づく色情報処理機構のモデルを提唱したい。また、これら機能を同定した神経群に対し、遺伝学的手法を用いて機能を阻害し、色識別能に与える影響について行動実験を用いて検証することができる。電気生理学的実験のデータから得られた色覚情報処理機構のモデルを行動実験によって検証したい。

参考文献

- 1) Sanes JR, Zipursky SL. Neuron. 2010.
- 2) Menzel R, Backhaus W. Facets of Vision. 1989
- 3) Morante J, Desplan C. Curr Biol. 2008.
- 4) Gao S et al. Neuron. 2008.
- 5) Seki Y et al. J Neurophysiol. 2010.
- 6) Stensmyr MC et al. Cell. 2012.
- 7) Otsuna H et al. Front Neural Circuits. 2014.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4件)

Yonekura T, Miyakawa H, Morimoto T, Seki Y. Electrophysiological Approaches to Understanding Color Vision Processing in *Drosophila melanogaster*. 第38回日本神経科学大会, 2015年7月28~31日, 神戸

Seki Y, Nakamura N, Yonekura T, Yamada R, Nitta H, Miyakawa H, Morimoto T. Electrophysiological and behavioral approaches to understanding the neural basis of color vision in *Drosophila melanogaster*. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11~13日, 横浜

Seki Y, Nakamura N, Yonekura T, Yamada R, Nitta H, Miyakawa H, Morimoto T. Electrophysiological and behavioral approaches to understanding color vision in *Drosophila melanogaster*. 11th International Congress of Neuroethology and 36th Annual Meeting of The Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry, 2014年7月28~8月2日, 札幌

Nakamura N, Yamada R, Miyakawa H, Morimoto T, Seki Y. Evaluation of color discrimination in *Drosophila melanogaster*

using an appetitive conditioning assay. 第11回日本ショウジョウバエ研究会 (JDRC11), 2014年6月4~6日, 金沢

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関 洋一 (SEKI YOICHI)

東京薬科大学 生命科学部 助教

研究者番号 : 30634472